

SZEKUNDUMOS KÉSLELTETETT LUMINESZCENCIA
KOMPONENSEK VIZSGÁLATA KLOROPLASZTISZOKBAN

Egyetemi doktori disszertáció

Hideg Éva

MTA SZBK Növényélettani Intézet, Szeged

1986



B 2699

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	1
2. Irodalmi áttekintés	5
2.1. A késleltetett lumineszcencia jelensége	5
2.2. A késleltetett lumineszcencia értelmezése: a töltés- rekombinációs modell	7
2.3. Egy speciális késleltetett lumineszcencia: a termo- lumineszcencia	9
2.4. A késleltetett lumineszcencia komponensei	13
2.5. A késleltetett lumineszcencia oszcillációja; feltételezések a lassu komponens eredetére vonatkozóan	14
2.5.1. A termolumineszcencia B sávja és a késleltetett lumineszcencia lassu komponense	16
3. Célkitűzések	18
4. Anyagok és módszerek	19
4.1. Kloroplasztisz izolálás	19
4.2. A késleltetett lumineszcencia mérése	20
4.3. Oxigén mérés Clark-féle elektróddal	21
4.4. Számítások	22
4.4.1. A késleltetett lumineszcencia görbék felbontása komponensekre	22
4.4.2. A számított oszcillációs képek	24
5. Eredmények és megvitatásuk	25
5.1. A szekundumos késleltetett lumineszcencia komponen- sekre bontása	25
5.2. A lassu, szekundumos késleltetett lumineszcencia eredete	26

5.2.1. Közvetlen kísérleti bizonyíték a másodlagos akceptor szerepére	26
5.2.2. A degradációs hatások kiküszöbölése	31
5.2.3. A lassu komponens oszcillációjának számítógépes modellezése	33
5.3. A gyors, szekundumos késleltetett lumineszcencia komponens eredete	36
5.3.1. A lassu komponens kiküszöbölése	36
5.3.2. A gyors komponens oszcillációja	38
5.4. A szekundumos késleltetett lumineszcencia komponensek egy alkalmazási lehetősége	42
6. Összefoglalás	46
Köszönetnyilvánítás	
Irodalom	

1. Bevezetés

A fotoszintézis fizikai, kémiai és biológiai szempontból egyaránt komplex folyamata során a növényekben a fényenergia szerves vegyületek kémiai kötéseinek energiájává alakul. Az így raktározott kémiai energia egyrészt a növény saját életfolyamatainak energiaszükségletét fedezi, másrészt - közvetve - más élőlények számára is energiaforrásként szolgál. A fotoszintézis reakcióit a lejátszódó folyamatok természete szerint három nagyobb szakaszra osztjuk.

Az első /un. fotofizikai szakaszban/ a fotoszintetikus pigmentekben /klorofillok és más járulékos fotoszintetikus pigmentek/ megtörténik a későbbi folyamatok során hasznosuló fényenergia elnyelődése. A reakciócentrum klorofill molekulája a fény hatására gerjesztett állapotba kerül. A gerjesztési energia stabilizálódására akkor kerül sor /a második, un. fotokémiai szakaszban/, amikor a gerjesztett klorofill molekula alapállapotba tér vissza, ami a reakciócentrumhoz csatlakozó elektrontranszportlánc akceptor oldalának redukált, donor oldalának pedig oxidált állapotba hozásával töltésszétválást eredményez. Ezt követően a szétvált töltések redox reakciók sorozatán keresztül stabilizálódnak az elektrontranszportlánc komponensein, ahol két fotokémiai rendszer együttműködésének eredményeként egyrészt oxigén felszabadulással járó vízbontás történik, másrészt a fotoszintézis biokémiai szakaszában lejátszódó folyamatok számára szükséges NADPH és ATP keletkezik. Ebben a harmadik szakaszban történik

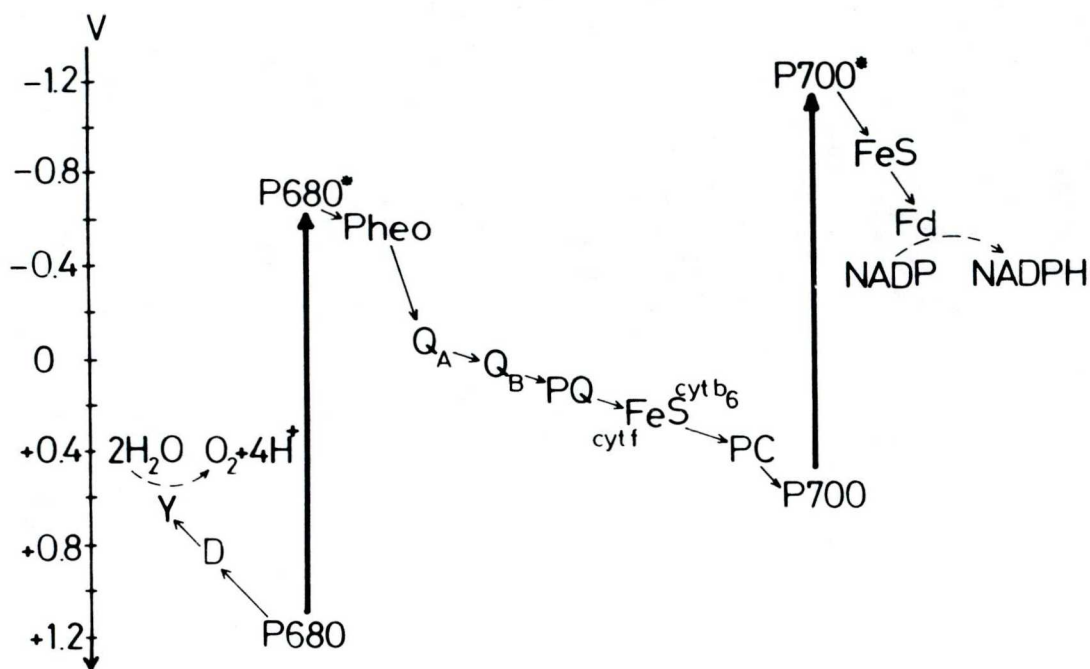
a szén-dioxid megkötése, ami energiában gazdag, magas redukáltsági fokú vegyületek: szénhidrátok keletkezését eredményezi.

A fotoszintézis szakaszainak ezen rövid vázlata után valamivel részletesebben foglalkozunk a fotokémiai szakaszban lejátszódó töltéssztabilizáció helyével, a fotoszintetikus elektrontranszport lánc komponenseivel. Az 1. ábra az első és második fotokémiai rendszer vázlatát mutatja: az elektrontranszportlánc komponenseket az un. Z-sémában /Hill és Bendal, 1960/ elhelyezve.

A két fotokémiai rendszer együttműködése során elektronok jutnak a kb. $+0.8$ V redoxpotenciális viz/oxigén rendszerből a kb. -0.32 V redoxpotenciális NADPH/NADP⁺ rendszerbe egy olyan speciális úton, amely két szakaszán is az elektron számára kedvező energiagradienssel ellentétes. Ezeken a helyeken a továbblépéshez szükséges energiát a két fotokémiai rendszer reakciócentrumában elnyelt fényenergia adja.

A második fotokémiai rendszer reakciócentrumában /P680 jelöli az 1. ábrán a 680 nm-nél mutatott jellegzetes fényindukált abszorpcióváltozása alapján/ a klorofill-a fény hatására gerjesztett állapotba kerül. Amikor ebből a gerjesztett állapotból alapállapotba visszatér, a második fotokémiai rendszer akceptor oldala redukált, donor oldala pedig oxidált állapotba kerül.

A donor oldalon először egy primer donor /D/ oxidálódik, majd a pozitív töltés az un. vízbontó enzimre /Y/ kerül. Mivel egy molekula víz felbontásához négy pozitív



1. Ábra

A fotoszintetikus elektrontranszportlánc (Z-séma) vázlata. (Jelmagyarázat a szövegben.)

töltés szükséges, a vizbontó enzim működésének leírására Kok és mtsai /1970/ egy több töltéstároló állapotból /az un. S-állapotokból/ álló töltésgyűjtő rendszer létezését feltételezték. Ezek az állapotok a második fotokémiai rendszerben keletkező pozitív töltések felvétele közben ciklikusan egymásba alakulnak át. A vizbontásban közvetlenül csak a négy pozitív töltéssel rendelkező S_4 állapot vesz részt, amely eközben S_0 állapotba megy át. A Kok-féle modell az $S_0 - S_4$ állapotok feltételezésével megmagyarázta az oxigén polarizációs mérések során kapott négyes periódusu oszcillá-

ciót. /Joliot és mtsai, 1969. Maximális oxigénfejlődést a harmadik, hetedik, tizenegyedik stb. gerjesztő fényimpulzus után mérték./

Az akceptor oldalon a gerjesztett $P680$ / $P680^*$ / alapállapotba kerülésekor a donor oldali oxidációs folyamatokkal egyidejűleg redukációs folyamatok játszódnak le. Az akceptor oldalon először egy feofitin molekula /Pheo jelöli az 1. ábrán/, egy magnéziumot nem tartalmazó klorofill redukálódik. A feofitintól az így felvett elektront egy kinonmolekula /a Q_A , amit történeti okokból a PS-2 elsődleges akceptorának nevezünk/ veszi át, amit az elektrontranszportláncban egy másik, két elektron tárolására alkalmas kinonmolekula / Q_B , a másodlagos akceptor/ követ. A Q_B egyszeresen redukált állapota sötétben viszonylag hosszú ideig stabil, míg a kétszeresen redukált állapot gyorsan visszaalakul oxidált állapottá, miközben két elektron továbbitódik a plasztokinon-gyűjtő /PQ/ felé. A Q_B kételektronos "kapu" szerepét az indokolja, hogy a plasztokinon hid-rokinonná redukálásához két elektron szükséges /Bouges-Bocquet, 1973; Pulles és mtsai, 1976/. A redukált plasztokinont egy vasat és ként tartalmazó protein /az ún. Rieske-féle centrum/ és az ezzel szorosan asszociálódott két citokróm komponens /citokróm- b_6 és citokróm-f/ oxidálja. Az elektrontranszport egy réztartalmu komponensen /plasztocianin, PC/ keresztül folytatódik, ezt a komponenst az egyes fotokémiai rendszer gerjesztett reakciócentruma /P700/ által keltett töltésszétváláskor

keletkező pozitív töltés oxidálja. Ez a fotoszintetikus elektrontranszportlánc ún. nem ciklikus működési módja, melynek során a P700 akceptor oldalán létrejövő erősen redukáló komponens a ferredoxinokon /redox reakciókra képes nem hem-jellegű vasproteinek/ keresztül egy katalizáló enzim /a ferredoxin - NADP - oxidoreduktáz/ segítségével a NADP-t redukálja. A redukált-NADP valamint a két fotokémiai rendszer működése közben képződő ATP biokémiai reakciók redukálószeré ill. energiaszolgáltatójaként jut fontos szerephez a fotoszintézis további reakciói során.

Látható, hogy az elektrontranszportláncban lejátszódó töltésszétválási és töltéstárolási folyamatok mennyire létfontosságúak és alapvető szerepük a fotoszintézis reakcióinak sorozatában. A továbbiakban az elektrontranszportlánc egy szakaszán, a második fotokémiai rendszerben lejátszódó folyamatokról, ill. ezeknek lumineszcencia módszerekkel történő vizsgálatáról lesz szó.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A késleltetett lumineszcencia jelensége

A fotoszintézis lumineszcencia módszerekkel történő vizsgálata Strehler és Arnold /1951/ felfedezésétől szármitható, akik megvilágított kloroplasztiszokban a megvilágítás befejezése után /még néhány perccel később is/

mérhető lumineszcencia fényt tapasztaltak. A jelenséget leveleken /Strehler, 1951/ és később fotoszintetizáló baktériumokon /Arnold és Thompson, 1956/ is megfigyelték. Az így mért késleltetett lumineszcenciáról⁺ kimutatták, hogy a fotoszintetikus elektrontranszportlánc aktivitásával szoros összefüggésben van, és feltételezték, hogy a fotoszintézis során lejátszódó reakciók megfordításából származik. Ezzel megalapozták a késleltetett lumineszcencia eredetét magyarázó un. rekombinációs hipotézist, amely az irodalomban fellelhető más magyarázatok - pl. az Arnoldtól származó lyuk - rekombinációs hipotézis /Arnold és Azzi 1968, 1971; Bertsch és mtsai, 1971/ vagy a triplett-triplett annihilációs hipotézis /Stacy és mtsai, 1971; Shuvalov, 1976/- mellett ma is a legelfogadottabb /Velthuys és Ames, 1974; Lavorel, 1975a; Malkin, 1977/. A feltételezést, hogy a késleltetett lumineszcenciát a töltésszétválás után a reakciócentrumot újra gerjesztett állapotba hozó rekombináció okozza, jól bizonyítja Velthuys és Ames /1973/ kísérlete, melyben a PS-2 akceptor oldali komponenseit kloroplasztiszokban Na-ditionittal redukálva a késleltetett lumineszcencia intenzitásának növekedését tapasztalták.

A késleltetett lumineszcencia főleg a második fotokémiai rendszerre jellemző /Ames és van Gorkom, 1978/,

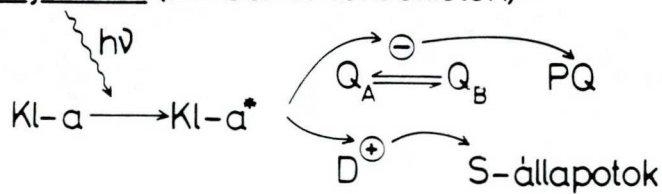
⁺A jelenséget Strehler és Arnold "delayed luminescence" terminológiájának tükörfordításaként késleltetett lumineszcenciának fogjuk a dolgozatban nevezni, megjegyezve, hogy a későbbi angol nyelvű irodalom vegyesen használja a kezdeti elnevezést a "delayed fluorescence" és "delayed light emission" kifejezésekkel.

bár Shuvalov /1976/ az egyes fotokémiai rendszerrel kapcsolatba hozható késleltetett lumineszcencia komponens is megfigyelt, és lehetséges, hogy a távoli vörös fénnel gerjeszthető, több perces fél-élettartamu komponensek /Björn, 1971; Bertsch és Azzi, 1964/ is kapcsolatosak az egyes fotokémiai rendszerrel, de ezek intenzitása jóval kisebb, mint a második fotokémiai rendszerhez rendelhető komponenseké.

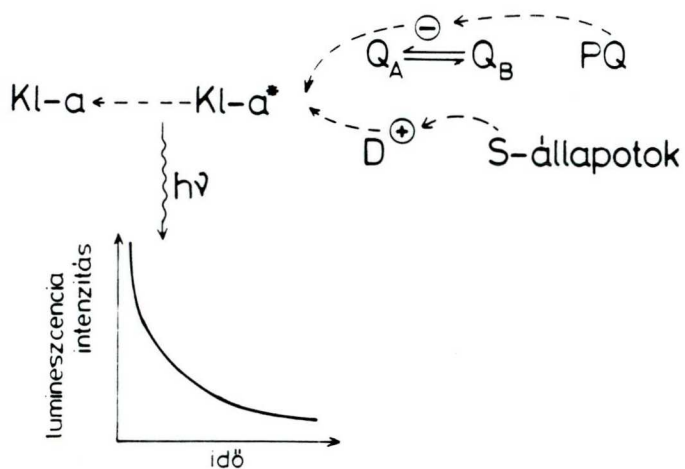
2.2. A késleltetett lumineszcencia értelmezése: a töltésrekombinációs modell

A rekombinációs elmélet alapján a késleltetett lumineszcencia létrejötté a 2. ábrán vázolt séma alapján képzelhető el. A második fotokémiai rendszer reakciócentrumának klorofill-a molekulája /Kl-a/ fény hatására gerjesztett állapotba kerül /Kl-a^{*}/. Alapállapotba történő visszatérése töltésszétválást eredményez: a donor oldal oxidálódik, az akceptor oldal redukálódik. Az így kialakuló töltéspár pozitív tagja a donor oldalon, negatív tagja pedig az akceptor oldalon az előbbieken ismertetett redox folyamatok során "vándorol" az elektrontranszport láncban a vízbontó enzim ill. az egyes fotokémiai rendszer felé. Ennek során a töltéspár energiája fokozatosan csökken /tulajdonképpen az egyes lépések közötti csekély energiavesztés okozza a stabilizációját/. Megfelelő gerjesztési hőmérséklet esetén azon-

Gerjesztés (szobahőmérsékleten)



Megfigyelés (szobahőmérsékleten)



2. Ábra

A késleltetett lumineszcencia jelenségének értelmezése a töltésrekombinációs hipotézis alapján.
(Jelmagyarázat a szövegben.)



ban, a környezet hőenergiájából pótolva a visszafelé lépések energiakülönbségét, létrejöhetnek az előbbiekkel ellentétes irányú reakciók is. Szobahőmérsékletű gerjesztéskor lehetőség van arra /ahogy azt a 2. ábra alsó része mutatja/, hogy a visszafelé irányuló reakciók eredményeként a reakciócentrum újra gerjesztett állapotba kerüljön /ezuttal fénygerjesztés nélkül/, és alapállapotba történő visszatérésekor sor kerüljön a megfigyelhető lumineszcencia fény kibocsájtására.

A késleltetett lumineszcencia töltésrekombinációs hipotézis alapján történő értelmezéséből következik, hogy a késleltetett lumineszcenciát okozó rekombinációban résztvevő töltések redox távolsága szoros kapcsolatban van a fél-élettartammal: nagyobb távolságból történő rekombinációhoz hosszabb fél-élettartamu komponens tartozik. Mivel a gerjesztés és megfigyelés egyaránt szobahőmérsékleten történik, a késleltetett lumineszcenciát eredményező rekombinációs folyamatban többféle akceptor-donor pár is előfordulhat mint töltésforrás, így a szobahőmérsékletű késleltetett lumineszcencia mérésben több komponens előfordulása várható.

2.3. Egy speciális késleltetett lumineszcencia: a termolumineszcencia

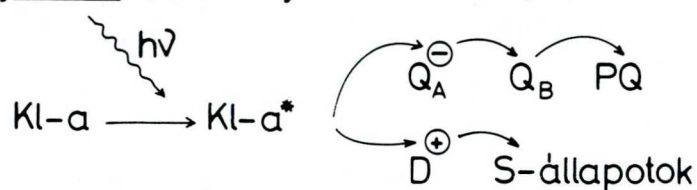
A fotoszintetikus elektrontranszportláncban végmenő töltésszétválási és töltéstárolási folyamatok vizs-

gálatára a késleltetett lumineszcencia mérések mellett gyakran alkalmazzák a termolumineszcencia módszerét is. Mivel a dolgozatban leírt késleltetett lumineszcencia eredmények is szorosan kapcsolódnak az ugyanezen a területen végzett termolumineszcencia kutatásokhoz, a következőkben röviden ismertetjük a kloroplasztiszokon megfigyelhető termolumineszcencia jelenségének lényegét.

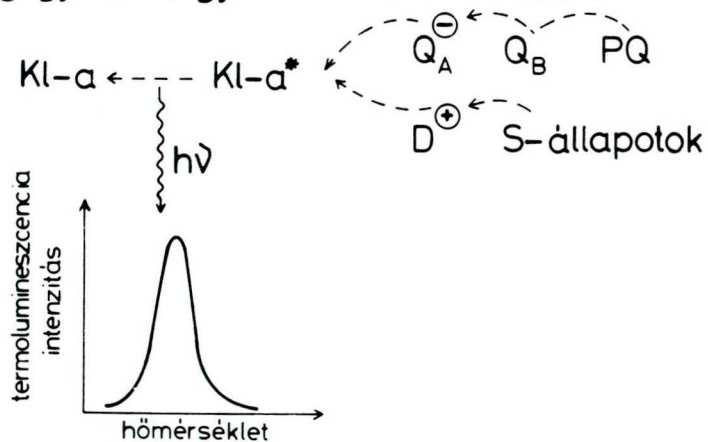
A termolumineszcenciát gyakorlatilag a késleltetett lumineszcenciával egyidejűleg fedezte fel Strehler és Arnold /1951/. A jelenséget a késleltetett lumineszcenciával egységes elméleti alapokon a töltésrekombinációs hipotézissel magyarázták /Arnold és Sherwood, 1957/, amely a későbbiekben további pontosítások és módosítások során vált a termolumineszcencia jelenleg elfogadott modelljévé /Vass és mtsai, 1980; DeVault és mtsai, 1983; Összefoglaló Szalay és Demeter 1986-os munkája/.

Ennek alapján a termolumineszcencia kialakulását a 3. ábrán vázoltuk. Az alacsony hőmérsékletű megvilágítás során gerjesztett reakciócentrum alapállapotba történő visszajutásakor töltésszétválás zajlik le, ugyanúgy mint a késleltetett lumineszcencia esetében. A közeg /szobahőmérsékletű állapothoz képest/ kisebb hőenergiája miatt azonban a töltések "csapdázódnak" az elektron-transzportlánc akceptorain ill. donorain /3. ábra felső része/. A visszafelé irányuló folyamatok megindulására csak a hőmérséklet emelésekor van lehetőség, ekkor történik meg a termolumineszcenciát eredményező rekombináció /3. ábra alsó része/. A megfigyelés során a folyamatos,

Gerjesztés (alacsony hőmérséklet)



Megfigyelés (egyenletes fűtés közben)



3. Ábra

A termolumineszcencia jelenségének értelmezése a töltésrekombinációs hipotézis alapján.
 (Jelmagyarázat a szövegben.)

állandó sebességű fűtés mellett a hőmérséklet függvényében ábrázolva a mért lumineszcenciafény intenzitását, jellegzetes, maximummal rendelkező görbét kapunk. A kloroplasztiszok termolumineszcenciájának elmélete /Vass és mtsai, 1980/ alapján következik, hogy a termolumineszcencia görbe maximumának helye /a maximum-hőmérséklet/ a késleltetett lumineszcencia fél-élettartamához hasonlóan jellemző a rekombinálódó töltések redoxállapotára.

Ha az alacsony hőmérsékletű gerjesztés folyamatos fénnnyel történik, ez többféle akceptor és donor feltöltődését is jelentheti, azonban, ha a gerjesztés olyan fényimpulzus, ami elektrontranszportlánconként egyetlen töltéspár kialakulását eredményezi, akkor a töltésszétválás után az alacsony hőmérsékleten végsősoron csak egy akceptor kerül redukált állapotba és csak egyféle donor lesz oxidált. Így a termolumineszcencia görbe a gerjesztéstől függően több sáv szuperpozíciója, vagy csak egyetlen TL sáv /a 3. ábrán példaként fényimpulzus gerjesztésre kapott egyetlen sávot tüntettünk fel/. A két lumineszcencia jelenség mérésekor alkalmazott gerjesztési hőmérsékletek különbsége magyarázza tehát, hogy fényimpulzus gerjesztés esetén csak egyetlen termolumineszcencia sávot figyelhetünk meg, viszont ugyanilyen gerjesztő fényimpulzusra több késleltetett lumineszcencia komponens is jelentkezik.

A két lumineszcencia jelenség közös eredete - pontosabban az a tény, hogy a termolumineszcencia egy

speciális, az alacsony gerjesztési hőmérséklet miatt stabil töltéstároló állapotokból megvalósuló termikusan stimulált késleltetett lumineszcencia - lehetővé teszi, hogy a két mérési eljárást egymást kiegészítve lehessen alkalmazni a PS-2 töltéstároló állapotainak vizsgálatára.

2.4. A késleltetett lumineszcencia komponensei

Fényimpulzussal gerjesztett kloroplasztiszokban a késleltetett lumineszcencia a mikroszekundumostól a több perces időtartamig mérhető.

A megfigyelt késleltetett lumineszcencia a korábban tárgyalt elméleti megfontolásokkal összhangban általában több, exponenciális lecsengésű komponens szuperpozíciójának tekinthető /Malkin, 1977; Ames és van Gorkom, 1978/, bár az irodalomban vannak olyan elképzelések is, amely szerint nem minden késleltetett lumineszcencia komponens exponenciális /Lavorel 1975a/.

A legrövidebb, bizonyítottan fotokémiai reakcióval kapcsolatos jelet van Best és Duysens /1977/ mérték kb. 0.6 μ sec félélettartammal, de például Gulotty és mtsai /1985/ mutáns algákban pikoszekundumos fél-élettartamu jelet is mértek. Normális működésű kloroplasztiszokban a mikroszekundumos /Lavorel, 1973/ és néhány miliszekundumos /1-10 ms/ /Lavorel, 1975; Ruby 1968/ időtartományban mérhető késleltetett lumineszcencia komponenseket a primer akceptorról származó negatív töltés és a töltés-

szétválás után még igen rövid ideig pozitív reakciócentrumról /van Best és Duysens, 1977; Klimov és mtsai, 1977/ vagy valamilyen a reakciócentrumhoz közeli donorról /Lavorel 1973/ származó pozitív töltés rekombinációjaként értelmezik. Az ezeknél hosszabb időtartományba eső komponenseket eredményező töltéspár származási helyéül az akceptor és a donor oldalon egyaránt a reakciócentrumtól nagyobb távolságban levő elektrontranszportlánc komponenseket kell feltételezni.

Azt a feltételezést, hogy a donor oldalon a rekombinációban résztvevő pozitív töltések a primer donor helyett a reakciócentrumtól nagyobb redox távolságban levő vízbontó enzimről is jöhetnek meggyőzően alátámasztja a késleltetett lumineszcencia intenzitásában megfigyelhető oszcilláció.

2.5. A késleltetett lumineszcencia oszcillációja; feltételezések a lassu komponens eredetére vonatkozóan

Fényimpulzus sorozattal történő gerjesztés esetén a késleltetett lumineszcencia gerjesztés utáni adott időpillanathoz tartozó intenzitás-értékeit a fényimpulzusszám függvényében ábrázolva négyes periódusu oszcillációs kép alakul ki. Ennek jellegzetességeit elsőként Barbieri és mtsai /1970/ és Zankel /1971/ vizsgálta. Kutatásaik során a késleltetett lumineszcencia oszcillációs képeit a fényimpulzussal gerjesztett oxigén-

polarizációs mérések során tapasztalt négyes periódusu oszcillációs képpel /Joliot és mtsai, 1969/ összevetve vizsgálták. A késleltetett lumineszcencia oszcillációjának négyes periodicitása közvetlen kísérleti bizonyítékot nyújt arra, hogy a késleltetett lumineszcenciát eredményező rekombinációs folyamatban a pozitív töltések a vizbontó enzim S-állapotairól származnak. Az oszcillációs kép maximumai alapján következtetni lehet arra, hogy melyek a folyamatban legvalószínűbben résztvevő S-állapotok. A késleltetett lumineszcencia hosszabb idejű, szekundumos komponenseivel kapcsolatban sokáig az a nézet volt elterjedt, hogy oszcilláció ebben a tartományban nem figyelhető meg /Lavergne és Etienne, 1980/, ezért ezeknek a komponenseknek az eredete sem volt tisztázott. Az oszcillációs kép megfigyelésére valószínűleg azért nem került sor egészen a közelmúltig, mert a szekundumos időtartományban a késleltetett lumineszcencia a prompt fluoreszcenciához képest egyébként is kicsi fényintenzitása /Clayton, 1965, 1969/ a hosszú fél-életidejű komponensek esetében különösen kicsi /Malkin, 1977/.

Rutherford és Inoue /1984/ elsőként figyeltek meg oszcillációt a kloroplasztiszokon a szekundumos időtartományban mérhető késleltetett lumineszcencia intenzitásában, és ezt később leveleken is megmérték /Rutherford és mtsai, 1984/. Az általuk megfigyelt késleltetett lumineszcencia eredetét annak oszcillációs képe és a termolumineszcencia B sávjának oszcillációja közti analógia alapján adták meg.

2.5.1. A termolumineszcencia B-sávja és a késleltetett lumineszcencia lassu komponense

A kloroplasztiszokban mérhető termolumineszcencia +30°C körüli B-sávjáról /másnéven fősv/ megállapították, hogy a gerjesztő fényimpulzusok számának függvényében a csucsintenzitás négyes periódusu oszcillációt mutat a 2., 6. stb. fényimpulzusoknál tapasztalható maximumokkal /Rutherford és mtsai, 1982/. Ez egyértelműen utalt a vizbontó enzim szerepére a folyamatban. Mivel a Kok-féle modell szerint a sötétadaptált kloroplasztiszokban a vizbontó enzim domináns állapota az S_1 állapot / $S_0:S_1:S_2:S_3=25:75:0:0$ /, a második gerjesztő fényimpulzusra jelentkező maximum alapján következtettek az S_3 állapot kiemelt szerepére a B-sáv létrejöttében. Később kimutatták /Demeter és Vass, 1984/ hogy a B-sáv alacsony / $T < -60^\circ\text{C}$ / hőmérsékleten is gerjeszthető, ahol csak az $S_1 \rightarrow S_2$ átmenet lehetséges a vizbontó enzimben /Inoue és Shibata, 1978/, így a B-sáv létrehozásában a donor oldalon az S_3 állapot mellett az S_2 állapotról származó pozitív töltések is szerepet játszanak.

Rutherford és mtsai /1982/ az akceptor oldalon a termolumineszcencia sávot létrehozó rekombinációban résztvevő negatív töltések forrásaként az elektrontranszportlánc másodlagos akceptorát jelölték meg. Ezt a feltételezésüket közvetlen kísérleti bizonyítékként támasztja alá Demeter és Vass /1984/ azon megfigyelése, hogy a másodlagos akceptor közel 100%-os oxidálódásához vezető hosszú sötéttárolás után a másodlagos akceptor gerjesztő fényim-

pulzusonként ellenkezőre változó redoxállapota tükröződik a B-sáv kettős oszcillációjában.

Ezen megfigyelések alapján állapították meg a termolumineszcencia B-sávjáról /Rutherford és mtsai, 1982; Demeter és Vass, 1984/, hogy az $S_2 Q_B^-$ és $S_3 Q_B^-$ redoxállapotokból eredő töltésrekombináció eredményezi.

Mivel Rutherford és Inoue /1984/ az általuk leírt szekundumos késleltetett lumineszcencia oszcillációs képének vizsgálatakor négyes periódusu, a 2. és 6. /stb./ gerjesztő fényimpulzus után maximális intenzitású oszcillációt találtak, a termolumineszcencia B-sávjának az irodalomban már ismert /és a fentiekben részletezett/ magyarázata és a késleltetett lumineszcencia és a termolumineszcencia jelensége között meglevő /lásd. 2.3/ hasonlóság alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a megfigyelt késleltetett lumineszcencia feltételezhetően az $S_2 Q_B^-$ és $S_3 Q_B^-$ állapotokból ered.

3. Célkitűzések

Jelenlegi munkánkban a kloroplasztiszokon mérhető késleltetett lumineszcenciát vizsgáltuk a szekundumos időtartományban. Célul tűztük ki, hogy

- az ebben az időtartományban mérhető késleltetett lumineszcencia komponensekre bontása után közvetlen kísérletes bizonyítékot keresünk arra, hogy a Rutherford és Inoue /1984/ által felfedezett lassu komponens kialakulásában a másodlagos akceptor résztvesz.
- a mérési eredmények számítógépes modellezésével igazoljuk, hogy a lassu komponens az $S_2 Q_B^-$ és $S_3 Q_B^-$ redoxállapotokból származó rekombináció eredménye
- megvizsgáljuk hogyan alkalmazhatók a szekundumos időtartományba eső késleltetett lumineszcencia komponensek a második fotokémiai rendszerben lezajló töltésszétválási és tárolási folyamatok vizsgálatában.

eredete???

DL ϕ 1-4

+FeCy

DL ϕ onc.

onc. modell

27:75:0:0, 8% α
3% β
gyógyítás

4. Anyagok és módszerek

4.1. Kloroplasztisz izolálás

Méréseinkhez spenótból izolált kloroplasztiszokat használtunk, amiket a korábban leírt módon /Demeter és mtsai, 1985/ készítettünk el.

Az apróra vágott levéldarabokat izoláló pufferrel /0.4 M szorbit, 10 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 2 mM etiléndiamin-tetraecetsav, 2 mM Na-aszkorbát, 50 mM 2-N-morfolino-etánszulfonát, pH 6.5 és 0.4% bovin szérum albumin/ dörzsmozsárban eldörzsöltük és kétrétegű nyílonszűrőn /~ 30 µm pórusátmérő/ átszűrtük. A szűrletet 5 percig centrifugáltuk /2000xg/, majd az üledéket szuszpendáltuk /0.4 M szorbit, 10 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 2 mM etiléndiamin-tetraecetsav, 50 mM N-2-hidroxietyl piperazin-N'-2-etánszulfonát, pH 7.5/. A szuszpenzió klorofill tartalmát /klorofill-a + klorofill-b/ Arnon /1949/ módszere szerint acetonos kivonással határoztuk meg UNICAM SP 1800-as spektrofotométerrel.

Az izolált kloroplasztiszokat felhasználásukig kb. 100 µg /ml-es klorofill koncentrációban a szuszpendáló oldatban 4°C hőmérsékleten, sötétben tartottuk. Az oszcillációs kép változásait előidéző tárolásokat sötétben, szobahőmérsékleten végeztük.

Az alkalmazott herbicideket szobahőmérsékleten adtuk a mintákhoz. A ferricianidos kezelést Robinson és Crofts /1983/ módszere szerint végeztük. A kloroplasztisz szuszpenziót 150 µg /ml klorofill koncentrációra hígítottuk /0.1 M szorbitot tartalmazó, egyéb összetevőkben

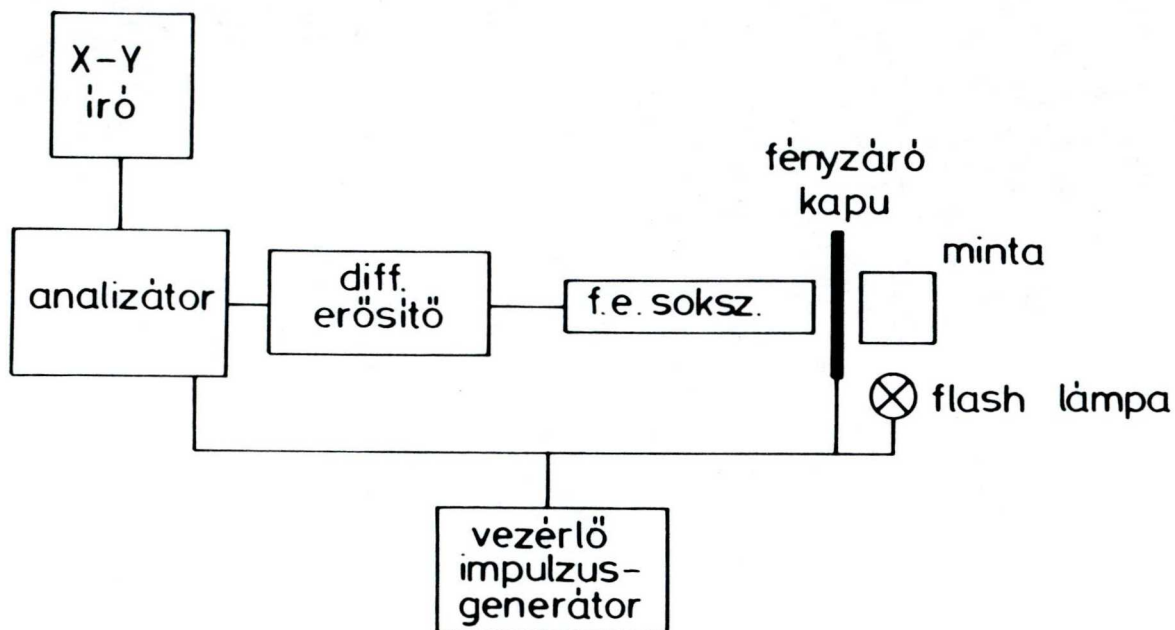


változatlan szuszpendáló pufferrel/, 50 $\mu\text{g/ml}$ ferri-cianiddal egy órán keresztül sötétben, 0°C -on, folyamatos keverés közben inkubáltuk, majd az eredeti szuszpendáló pufferrel sötétben kétszer átmostuk /5 perces centrifugálás, $2000\times g$, az üledéket kb. 5 ml szuszpendáló pufferben felsuszpendáltuk, megismételtük a centrifugálást és kb. 0.5 ml-ben szuszpendáltunk/. A kezelés után a kloroplasztiszokat felhasználásig sötétben, $+4^{\circ}\text{C}$ -on tartottuk a szuszpendáló pufferben.

4.2. A késleltetett lumineszcencia mérése

A késleltetett lumineszcencia méréshez a szuszpendáló oldattal 30 $\mu\text{g/ml}$ klorofill koncentrációra hígított mintákat használtunk 1 cm-es küvettában. A mérési elrendezés vázlata a 4. ábrán látható. A gerjesztés programozható impulzusgenerátorral vezérelt xenon flash-lámpával /General Radio, Stroboslave, 0.5J, 3 μsec / történt. Fényimpulzussorozat alkalmazásakor /az oszcillációs képek mérésénél/ a sorozat tagjai egymást 80 miliszekundumonként követték.

A megfigyelés kezeletlen kloroplasztiszok vizsgálatakor az utolsó gerjesztő fényimpulzus után 1 másodperccel kezdődött. DCMU-val /3-/3,4-diklórfenil/-1,1-dimetilkarbamid/ kezelt kloroplasztiszok késleltetett lumineszcencia oszcillációjának mérésekor 20 μM DCMU-t adtunk állandó keverés mellett a mintához közvetlenül az utolsó gerjesztő fényimpulzus után, majd 3 másodperc múlva kezdtük



4. Ábra

A késleltetett lumineszcencia mérő berendezés vázlata. (f.e.soksz.=fotoelektronsokszorozó, analizátor=KFKI ICA 70 sokcsatornás analizátor)

a megfigyelést. A megfigyelés minden esetben EMI 9558B fotoelektronsokszorozóval történt, és egy elektronikusan vezérelt fénykapu nyitásával kezdődött. A fotoelektronsokszorozó jelét egy, intézetünkben készült differenciál-erősítőn keresztül sokcsatornás analizátorba /KFKI, ICA 70/ vezettük. Az analizátorban tárolt jelet X-Y író segítségével rajzoltuk fel.

4.3. Oxigén mérés Clark-féle elektróddal

A koroplasztiszok oxigénfejlesztő képességének mérése folyamatos, telítési megvilágítás mellett Clark-típusu elektróddal történt a Droppa és mtsai /1981/ által leírt módszer szerint 3 ml pufferben /0.1M szorbit, 20 mM NaCl, 4 mM MgCl₂, 10 mM K₂HPO₄, 2mM etilén diamin-tetraecetsav, 50 mM N-2-hidroxietilpiperazin

-N' -2-etánszulfonát, pH 7.5/ 50 µg/ml klorofill koncentráció mellett, 0.25 mM p-benzokinon mesterséges elektronakceptor jelenlétében.

4.4. Számítási módszerek

4.1.1. A késleltetett lumineszcencia görbék felbontása komponensekre

A késleltetett lumineszcencia komponensek meghatározásakor a mért görbék exponenciálisokra való bontására a csillapított legkisebb négyzetek módszerén alapuló számítógépes illesztési eljárást alkalmaztuk /Marquardt, 1963/, amit korábban már sikerrel használtak fel abszorpciós spektrumok /Demeter és mtsai, 1974/ és termolumineszcencia görbék /Vass és mtsai, 1980/ bontásához.

Az általános módszer lényege, hogy az x_i / $i=1, \dots, n$ / pontokban mért y_i / $i=1, \dots, n$ / mérési pontokra az y/x_i analitikusan leírható függvényt illesztve a χ^2 paramétert minimalizáljuk az a_j / $j=1, \dots, N$ / illesztő paraméterek változtatásával / n : a mérési pontok, N : az illesztő paraméterek száma/:

$$\chi^2 := \sum_i \frac{1}{\sigma_i^2} (y_i - y(x_i))^2, \quad ,$$

ahol σ_i : az y_i bizonytalansága. χ^2 minimális, ha

$$\frac{\partial}{\partial a_j} \chi^2 = 0 \quad .$$

Az illesztő függvényt a_j körül elsőrendű Taylor-sorba fejtvé a paraméterfüggés linearizálható:

$$y(x) = y_o(x) + \sum_j \frac{\partial y_o(x)}{\partial a_j} \delta a_j$$

Ezt χ^2 minimalizálási feltételévé beírva újabb lineáris közelítéssel a következő egyenletrendszer adódik:

$$\beta_k = \sum_j \delta a_j \alpha_{j k} \quad (j, k=1, \dots, N)$$

ahol

$$\beta_k := \sum_i \frac{1}{\sigma_i^2} (y_i - y_o(x_i)) \frac{\partial y_o(x_i)}{\partial a_k}$$

$$\alpha_{j k} := \sum_i \frac{1}{\sigma_i^2} \left(\frac{\partial y_o(x_i)}{\partial a_j} \frac{\partial y_o(x_i)}{\partial a_k} \right)$$

A számítási eljárás célja az előbbi egyenletrendszerből a δa_j paraméterváltozások megadása. Marquardt /1963/ módszerének lényege, hogy egy λ paraméter bevezetésével az előbbi $\beta = \partial a \cdot \alpha$ egyenletrendszer helyett egy $\beta = \partial a \cdot \alpha'$ egyenletrendszert old meg, ahol

$$\alpha'_{j k} := \begin{cases} \alpha_{j k} (1 + \lambda) & , j=k \\ \alpha_{j k} & , j \neq k \end{cases}$$

Marquardt bebizonyította, hogy χ^2 minimumához közeledve λ nő. Az eljárás vázlata a következő:

- 1./ χ^2 számítása a kezdeti paraméterekből, $\chi^2/a/$.
- 2./ $\lambda = 0.001$
- 3./ ∂a és $\chi^2/a + \delta a/$ számítása a fenti egyenletrendszerből.

- 4./ ha $\chi^2/a + \delta a$ nagyobb, mint χ^2/a , λ növelése után visszatér a 3. pontra.
- 5./ ha $\chi^2/a + \delta a$ kisebb, mint χ^2/a , λ csökkentése és az $a' = a + \delta a$ helyettesítés után az a' paraméterekkel tér vissza a 3. pontra.

Az eljárásnak akkor van vége, ha χ^2 egy adott küszöbérték alá csökken.

4.4.2. A számított oszcillációs képek

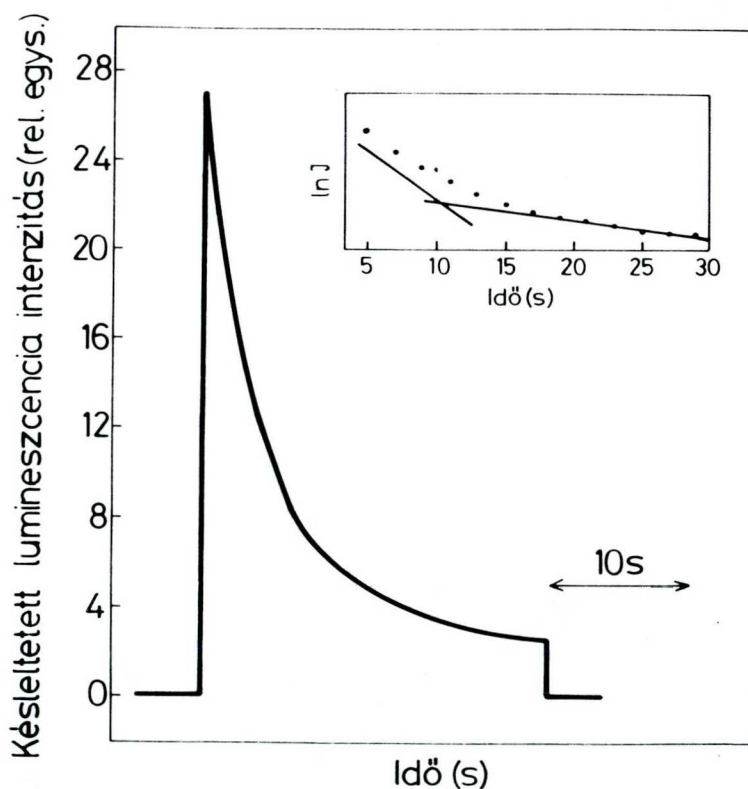
A késleltetett lumineszcencia oszcillációjának számítógépes modellezésekor a donor oldal leírására Lavorel /1976/ mátrix modellje alapján a vizbontó enzim S-állapotain a sötétadaptált mintákban $S_0:S_1:S_2:S_3 = 25:75:0:0$ százalékos töltésmegoszlást feltételeztünk. Az oszcillációs képben tapasztalható csillapodás magyarázatára alkalmaztuk azt a feltételezést is, amely szerint az i . S-állapotból az $/i+1/$ -be történő átmenet mellett kis valószínűséggel, de végbemehetnek $S_i \rightarrow S_{i+2}$ /"double hit"/ és $S_i \rightarrow S_i$ /"miss"/ folyamatok is /Forbush és mtsai, 1971; Lavorel, 1976; Wydrzynski és Sauer, 1980, Delrieu, 1974/. Ezekre a folyamatokra rendre 8% ill. 3% valószínűséget feltételeztünk.

Az akceptor oldalon a másodlagos akceptor működését a $Q_B \xrightarrow{h\nu} Q_B^- \xrightarrow{h\nu} Q_B^{2-}$ fényreakciók és $Q_B^{2-} \rightarrow Q_B$ sötétben lezajló reakció feltételezésével irtuk le /Bouges-Bocquet, 1973/. Meghatároztuk minden gerjesztő fényimpulzus után az $S_2Q_B^-$ és $S_3Q_B^-$ mennyiségét, és ezt a fényimpulzus-szám függvényében ábrázolva kaptuk az oszcillációs képeket.

5. Eredmények és megvitatásuk

5.1. A szekundumos késleltetett lumineszcencia komponensekre bontása

Az 5. ábrán az izolált kloroplasztiszokban fényimpulzus gerjesztés után mérhető késleltetett lumineszcencia időbeli változása látható. Az ábra felső részében



5. Ábra

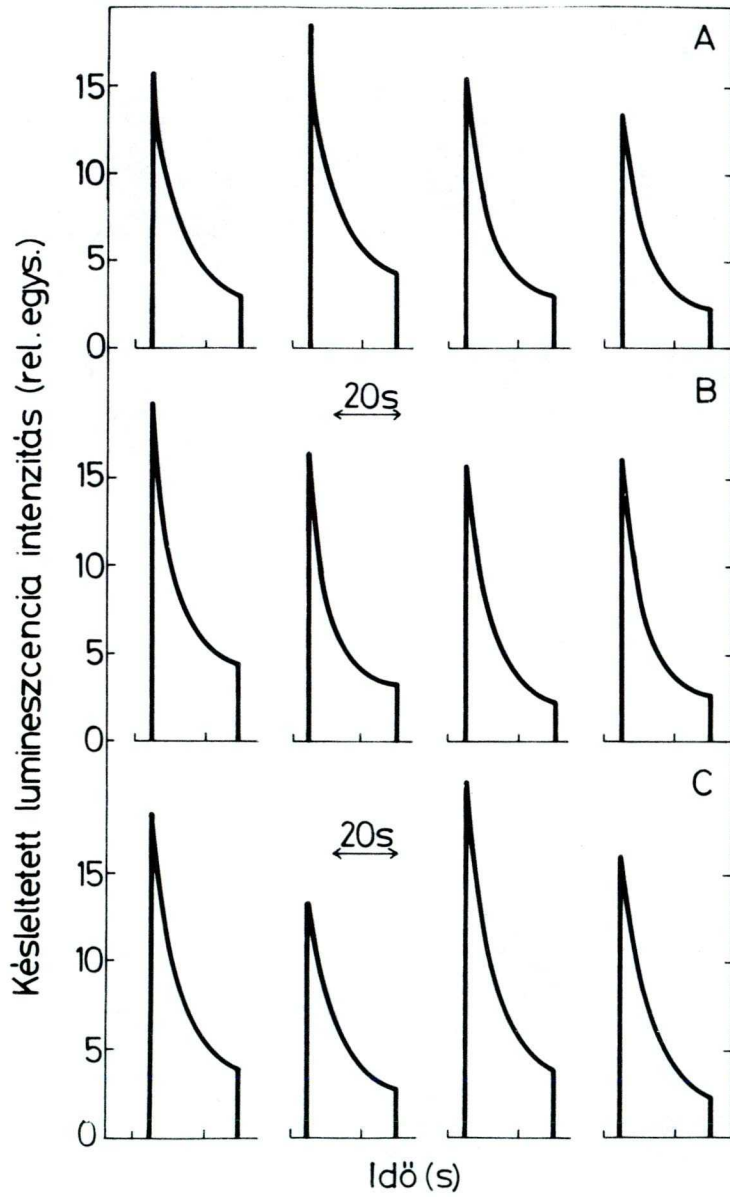
Az egy fényimpulzussal gerjesztett késleltetett lumineszcencia intenzitása izolált kloroplasztiszokban. Az inzerten a késleltetett lumineszcencia intenzitás logaritmusának időfüggése.)

levő inzerten a késleltetett lumineszcencia intenzitásának logaritmusát ábrázoltuk az idő függvényében. Ennek alapján a megfigyelt jel két exponenciális lefutású komponens összegének tekinthető, amelyek fél-élettartama ~ 2.9 sec és ~ 44 sec. A továbbiakban ezt a két komponenst fogjuk gyors és lassu szekundumos komponenseknek nevezni. A dolgozat következő részében először azt mutatjuk be, hogyan alakul a lassu komponens intenzitása a gerjesztő fényimpulzusok számának változásakor.

5.2. A lassu késleltetett lumineszcencia komponens eredete

5.2.1. Közvetlen kísérleti bizonyíték a másodlagos akceptor szerepére

A 6A ábrán látható, hogy a lassu komponens a második gerjesztő fényimpulzus után mutat maximális intenzitást. Ha az izolált kloroplasztiszokat a mérés előtt szobahőmérsékleten két órán át sötétben tároltuk, ez a maximum eltolódásához vezetett /6B ábra: az első gerjesztő fényimpulzus utáni késleltetett lumineszcencia intenzitás a második utánihoz képest megnövekedett. Ez az eltolódás összhangban van azzal a feltételezéssel /Rutherford és Inoue, 1984/, hogy a redukált másodlagos akceptorról Q_B^- eredő negatív töltések résztvesznek a lassu komponens eredményező rekombináció létrehozásában, mivel ez a maximum eltolódás a közvetlenül izolálás után fennálló $Q_B:Q_B^- \approx 50:50$ százalékos arány



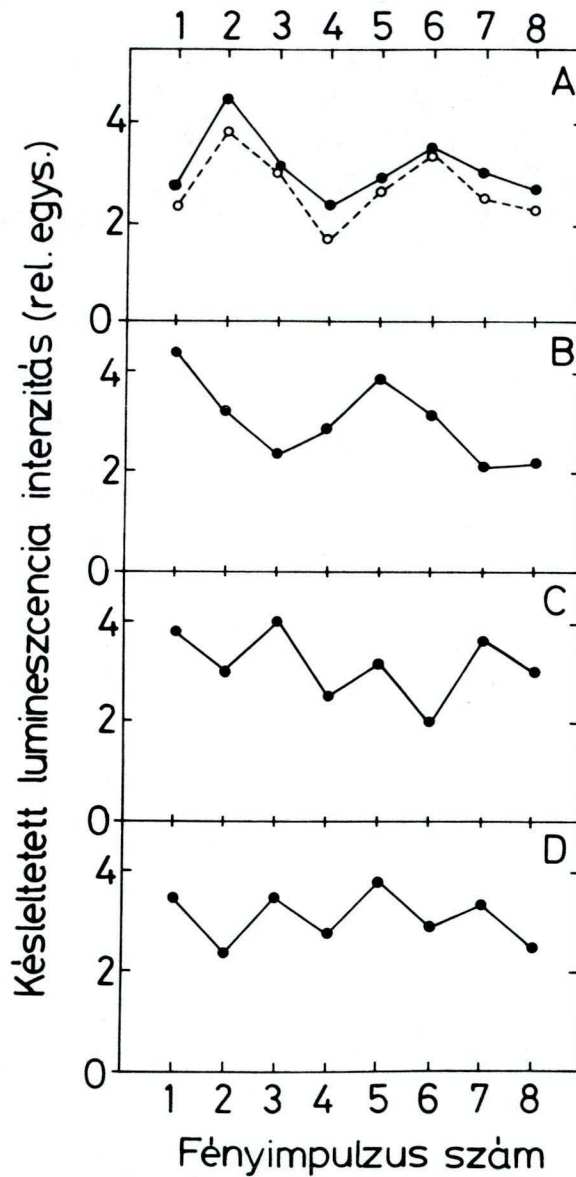
6. Ábra

A késllettett lumineszcencia intenzitása 1,2,3 és 4 gerjesztő fényimpulzus esetén (balról jobbra minden oszlopban) frissen izolált (A), két órán át (B) és négy órán át (C) sötétben tárolt kloroplasztiszokban.

megváltozását tükrözi, azt a korábbról ismert tényt, hogy a sötét tárolás során ez az arány fokozatosan eltolódik az oxidált állapot javára /Wollmann, 1978/. A nagyobb mennyiségű oxidált Q_B eredményeként az első gerjesztő fényimpulzus után a másodlagos akceptorok nagyobb része lesz redukált állapotban, ez tehát indokolhatja /a Q_B töltéstároló mechanizmusának figyelembevételével/ a lassu komponens relativ - sötétben történő tárolás okozta -, intenzitásnövekedését az első gerjesztő fényimpulzus után a két fényimpulzus után mérhető fényintenzitáshoz képest.

Hosszabb tárolás /négy óra sötétben, szobahőmérsékleten/ hatását mutatja a 6C ábra. A $Q_B:Q_B^-$ arány tovább tolódott az oxidált állapotok javára, gyakorlatilag minden másodlagos akceptor oxidált, ezért a gerjesztő fényimpulzusok számának függvényében páratlan számú fényimpulzus után redukált, páros számú után oxidált másodlagos akceptorok jelenléte lesz jellemző. Ennek megfelelően a lassu késleltetett lumineszcencia egy vagy három fényimpulzussal gerjesztve lesz viszonylag nagy, kettő vagy négy gerjesztő fényimpulzus után pedig viszonylag kis fényintenzitású. Ez a megfigyelés közvetlen kísérleti bizonyítékot jelent arra, hogy a feltételezett mechanizmus az akceptor oldalt jól írja le: a lassu késleltetett lumineszcencia komponenst eredményező töltésrekombináció folyamatában a másodlagos akzeptorról származó negatív töltések vesznek részt.

A következő ábrán /7. ábra/ a különböző időtartamu tárolások hatását mutatjuk be az oszcillációs képek



7. Ábra

A lassú késleltetett lumineszcencia oszcillációja frissen izolált (A, folyamatos vonal), két órán át (B), négy órán át (C) sötétben tárolt és ferri-

cianiddal kezelt (D) kloroplasztiszokban.
(A, szaggatott vonal): a négy órán át sötétben tárolt minták mérés előtt újra megvilágítva.

alapján. /A lassu komponens vizsgálatakor az utolsó gerjesztő fényimpulzus után 30 szekundummal mért késleltetett lumineszcencia intenzitást ábrázoltuk a gerjesztő fényimpulzusok számának függvényében. Az így kapott pontsorozatot a szemléletesség kedvéért egyenes szakaszokkal kötöttük össze, ezt az ábrázolást nevezzük oszcillációs képnek./ A 7A ábrán az izolálás után /tárolás nélkül/ mérhető négyes periódusu, a második és hatodik fényimpulzus utáni maximumu oszcilláció látható /7A ábra, folyamatos vonal/. A 7B ábrán a viszonylag rövid /két órás/ szobahőmérsékletű tárolás hatása figyelhető meg: az oszcilláció négyes periódusa megmarad, de a $Q_B:Q_B^-$ arány az előbbiekben részletezett megváltozása miatt eltolódott maximumhelyzet figyelhető meg az első és ötödik fényimpulzus után. A 7C ábra a hosszú /négy óra/, szobahőmérsékleten történő sötéttárolás hatását mutatja: a késleltetett lumineszcencia oszcillációja kettes periódusu, követi a másodlagos akceptor redox-állapotának oszcillációját.

A Q_B oxidálódását nemcsak hosszú sötét-tárolással érhetjük el, hanem oxidálószerrel is. Robinson és Crofts /1983/ kimutatták, hogy izolált kloroplasztiszokat kálium-ferricianiddal kezelve a fotoszintetikus elektroszportláncban a másodlagos akceptorok több mint 95%-a oxidált állapotba hozható. Az általuk leírt módszerrel kezelt kloroplasztiszokban a lassu késleltetett lumineszcencia ugyanolyan kettes periódusu oszcillációját tudtuk kimutatni, mint a hosszú, szobahőmérsékletű sötét-



tárolásnak kitett mintákban /7D ábra/. Ez azt is igazolja, hogy a hosszú sötét-tárolással valóban előidéz-
tük a másodlagos akceptor oxidálását.

Ha a négy órán át sötétben, szobahőmérsékleten tárolt mintákat újra megvilágítjuk és megmérjük a különböző számú gerjesztő fényimpulzusra adott szekundu-
mos lassu késleltetett lumineszcencia jelet, azt tapasztaljuk, hogy visszaállítható az izolálás után /hosszu tárolás nélkül/ tapasztalt négyes periódusu, a második és hatodik fényimpulzus utáni maximumokkal rendelkező oszcilláció /7A ábra, szaggatott vonal/. Az így tapasztalt visszaállást a másodlagos akceptor szerepének eddigi értelmezése jól indokolja: az újbóli megvilágítás helyreállítja a tárolás során eltolódott $Q_B:Q_B^-$ arányt kb. 50:50 százalékosra, így az akceptor oldalon minden gerjesztő fényimpulzussorozat után ugyanolyan mennyiségű negatív töltés vehet részt a lassu komponenst eredményező töltésrekombinációs folyamatban, mint közvetlenül izolálás után.



$K(pH) = ?$

Q_B^- élettartama?

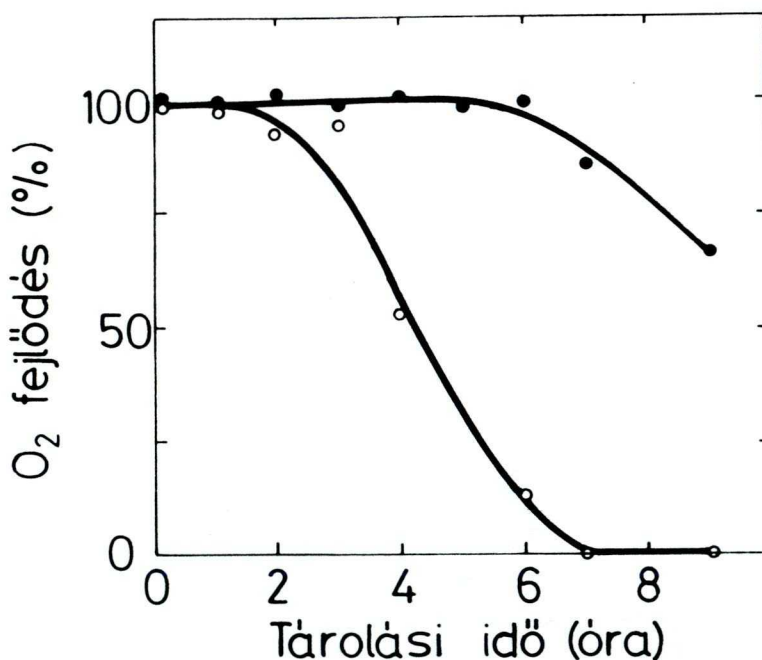
keletkező vívmolekulák
 Q_B, Q_B^-, Q_B^{2-}

5.2.2. A degradációs hatások kiküszöbölése

Az eddigiekben a lassu késleltetett lumineszcencia komponenst eredményező töltésrekombinációs folyamatban résztvevő töltések közül az akceptor oldalról származó negatív töltésekkel foglalkoztunk, közvetlen kísérleti bizonyítékot adtunk arra nézve, hogy a redukált másod-

lagos akceptorról származnak.

Felmerül a kérdés, hogy a kapott oszcillációs változások nem tulajdoníthatók-e a kloroplasztiszok szobahőmérsékletű tárolásával járó degradációnak, a donor oldal ebből fakadó változásának. Megvizsgáltuk, hogyan hat a szobahőmérsékletű tárolás az izolált kloroplasztiszok oxigén fejlesztő képességére. Eredményünket a következő ábra /8. ábra/ mutatja. Látható, hogy míg



8. Ábra

Az izolálás után szobahőmérsékleten sötétben (●), és fényben (○) tárolt kloroplasztiszok oxigén-fejlesztő képességének változása a tárolási idő függvényében.

a szobahőmérsékleten és fényben tárolt izolált kloroplasztiszok viszonylag rövid idő /kb. három óra/ alatt elvesztik oxigénfejlesztő képességük felét, addig a szobahőmérsékleten és sötétben tárolt kloroplasztiszok az oszcillációs változások vizsgálatakor alkalmazott leghosszabb /négy órás/ tárolási idő alatt is alig /kb. öt százalékot/ veszítenek oxigénfejlesztő képességükből. Ez azt mutatja, hogy az előbbiekben bemutatott kettes periódusu oszcilláció valóban az akceptor oldal változásait tükrözi: a négyórás szobahőmérsékletű sötét-tárolás a donor oldalon nem okoz jelentős változásokat.

5.2.3. A lassu komponens oszcillációjának számítógépes modellezése

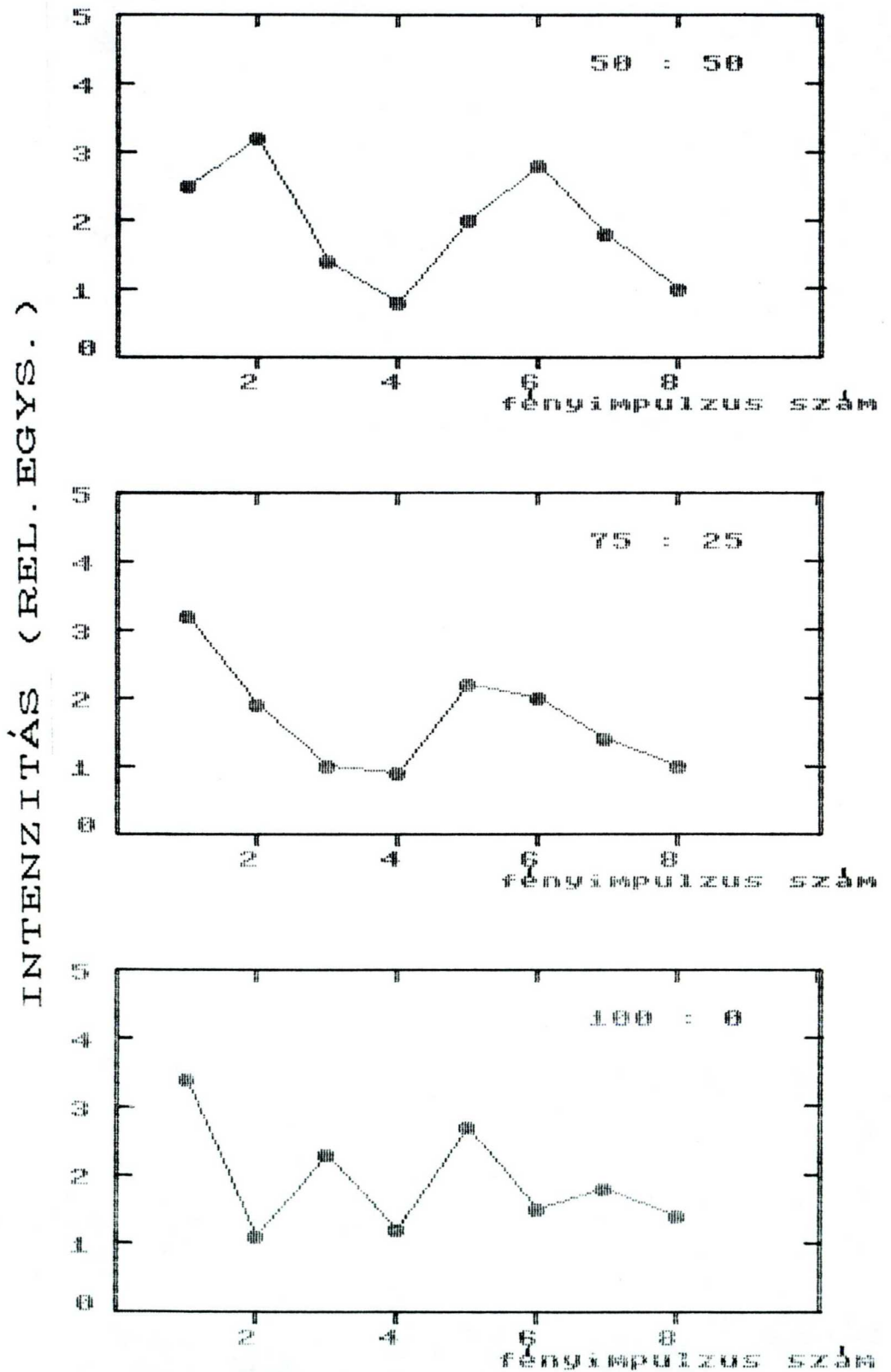
Az oszcillációs képek periodicitás vizsgálata arra utal, hogy a lassu késleltetett lumineszcencia létrejöttékor a másodlagos akceptorról eredő negatív töltések a vizbontó enzim S-állapotain tárolt pozitív töltésekkel rekombinálódnak. Annak érdekében, hogy a pozitív töltések pontos származási helyét megadjuk, a töltésrekombinációs folyamatot és ezen keresztül a lassu késleltetett lumineszcencia oszcillációs képét modelleztük, majd a modell-számítások eredményeit az előbbiekben ismertetett /és a 7. ábrán bemutatott/ mért oszcillációs képekkel hasonlítottuk össze.



Számításaink során feltételeztük, hogy a vizbontó enzimben a kezdeti $S_0:S_1:S_2:S_3=25:75:0:0$ százalékos megoszlás után a Kok-modell szerint történik az S-állapotok egymásba alakulása. A töltésrekombinációban résztvevő pozitív töltésekről feltettük, hogy az S_2 és S_3 állapotokról származnak. Ehhez az akceptor oldalon különböző $Q_B:Q_B^-$ százalékos megoszlásokat adtunk meg mint kiindulási/gerjesztés előtti/ értékeket, és meghatároztuk az $S_2Q_B^-$ és $S_3Q_B^-$ redoxállapotokból létrejövő töltésrekombinációból eredő késleltetett lumineszcencia relatív intenzitását különböző számú gerjesztő fényimpulzus hatására. Az így számított oszcillációs képek a 9. ábrán láthatók. Az ábrán feltüntettük azokat, a $Q_B:Q_B^-$ értékeket, amelyek mellett a számított oszcillációs képek legjobban követik a mért lassu késleltetett lumineszcencia oszcillációt.

A 9A. ábra azt mutatja, hogy az $S_2Q_B^-$ és $S_3Q_B^-$ állapotokból feltételezett rekombináció az irodalomból ismert $Q_B:Q_B^- = 50:50$ /Wollman, 1978/ százalékos megoszlást használva négyes periódusu oszcillációt ad, jól írja le a nem tárolt kloroplasztiszokban megfigyelhető, két ill. hat gerjesztő fényimpulzus után maximális késleltetett lumineszcencia jelenséget /vö. a 7A. ábrával/. A 9B. és 9C. ábrákat rendre összehasonlítva a 7B. és 7C. ábrákkal megállapíthatjuk, hogy az $S_2Q_B^-$ és $S_3Q_B^-$ állapotokból történő rekombináció feltételezése helytálló, ezzel a modellel a másodlagos akceptorok fokozatos oxidálódásával járó oszcillációs változásokat jól tudtuk

SZÁMITOTT KÉSZLELTETETT LUMINESZCENCIA



9. Ábra

A készleltetett lumineszcencia számított oszcillációs képei az ábrán jelölt $Q_B:Q_B^-$ arányok mellett az $S_2Q_B^-$ és $S_3Q_B^-$ állapotokból történő rekombinációt feltételezve.

követni a négyes periódust megőrző, de már eltérő maximumu /egy ill. öt gerjesztő fényimpulzus után maximális/ közbülső állapoton keresztül a gyakorlatilag teljesen oxidált Q_B -t jelző kettős oszcillációig.

A lassu szekundumos késleltetett lumineszcencia komponens $t_{1/2} \sim 44s$ / tehát az $S_2Q_B^-$ és az $S_3Q_B^-$ redoxállapotokból eredő rekombináció eredménye.

*Összefüggésben van
 S_2 és Q_B^- élettartamával?*

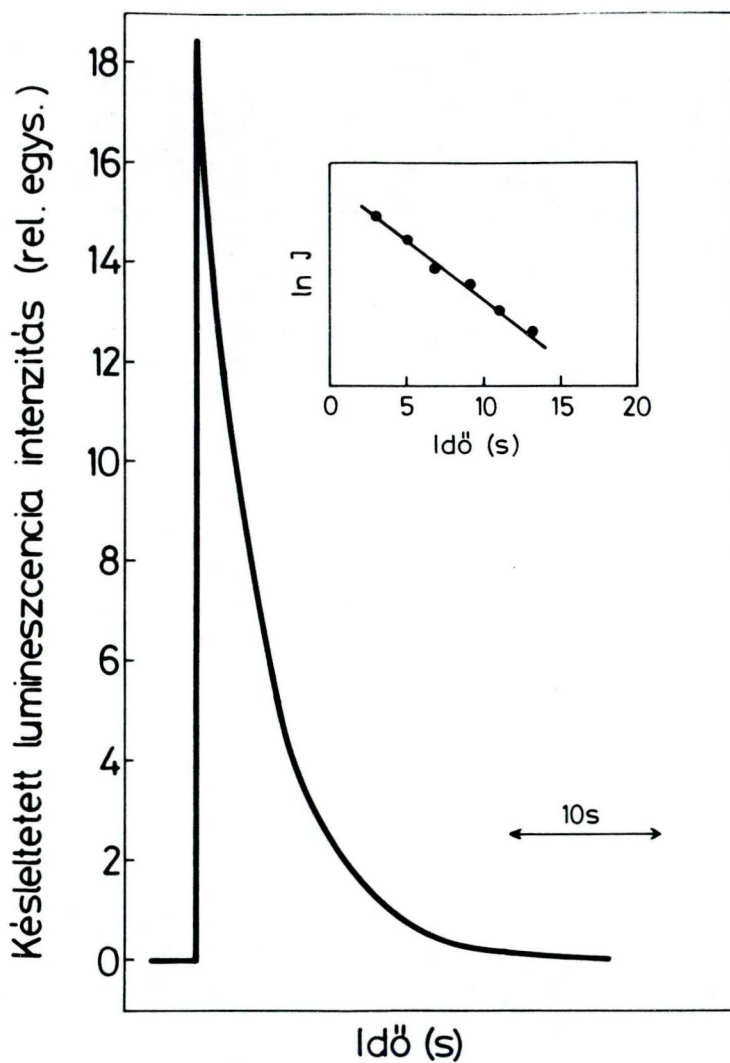
5.3. A gyors szekundumos késleltetett lumineszcencia komponens eredete

5.3.1. A lassu komponens kiküszöbölése

A lassu komponens eredetének tisztázása után a késleltetett lumineszcencia ~ 2.9 szekundumos fél-élettartammal jelentkező gyors komponensével foglalkozunk. Eredményeink tárgyalásának kezdetén /az 1. ábrán/ megmutattuk, hogy ez a gyors komponens szerepel az izolált kloroplasztiszokban mérhető késleltetett lumineszcencia komponensek között.

Ha az izolált kloroplasztiszokhoz a második fotokémiai rendszerben az elsődleges és másodlagos akceptor között gátló hatású DCMU-t /3-/3,4-diklórfenil/-1,1-dimetilkarbamid/ adunk, és megvizsgáljuk a mintában az egy gerjesztő fényimpulzusra válaszul kapott késleltetett lumineszcenciát, azt tapasztaljuk, hogy a lassu $t_{1/2} \sim 44s$ komponens eltűnik, a gyors komponens viszont változatlan marad /10. ábra/.

*Miért nem miért
hosszabb ideig?*



10. Ábra

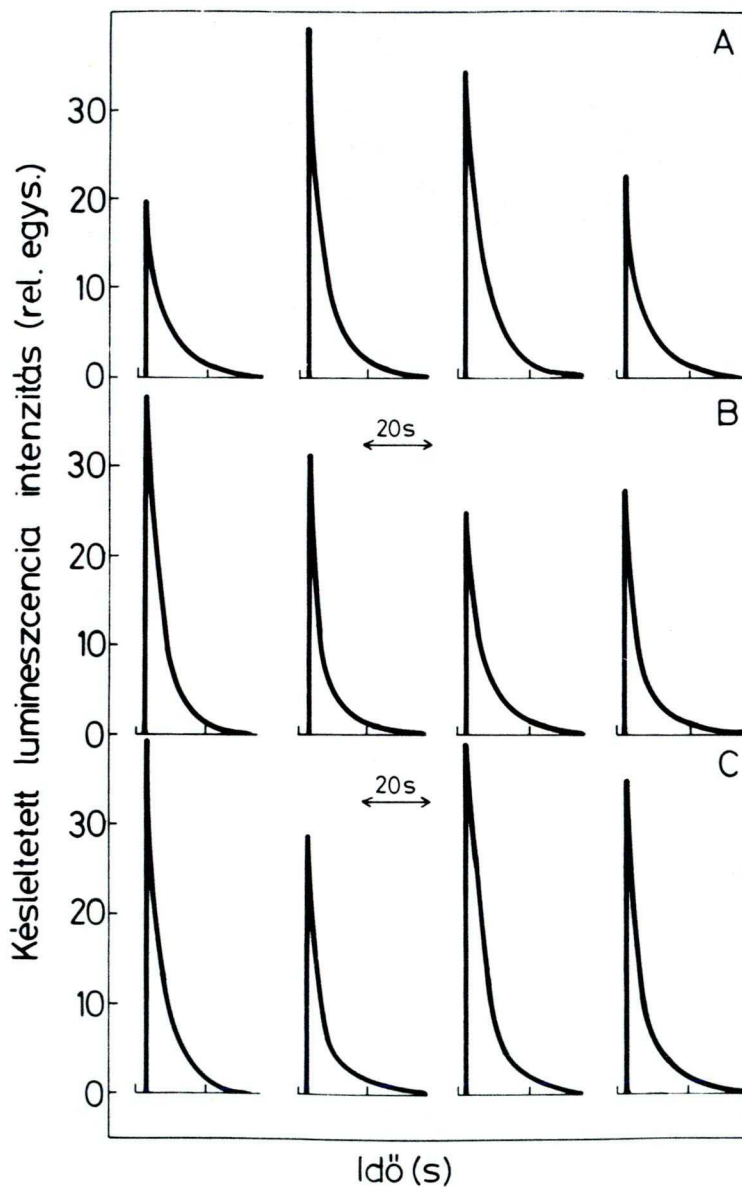
Az egy fényimpulzussal gerjesztett késleltetett lumineszcencia intenzitása a gerjesztés előtt DCMU-val kezelt izolált kloroplasztiszokban. Az inzerten az intenzitás logaritmusának időfüggése.

A lassu komponensről megállapítottuk, hogy az azt előidéző töltésrekombinációs folyamatban résztvevő negatív töltések a másodlagos akzeptorról származnak. Így nem meglepő, hogy mivel a gátolt elektrontranszportláncban az elektronok a fénygerjesztést követően nem juthatnak el a másodlagos akzeptorig, ezért innen töltésrekombinációs folyamatok sem indulhat ki.

5.3.2. A gyors komponens oszcillációja

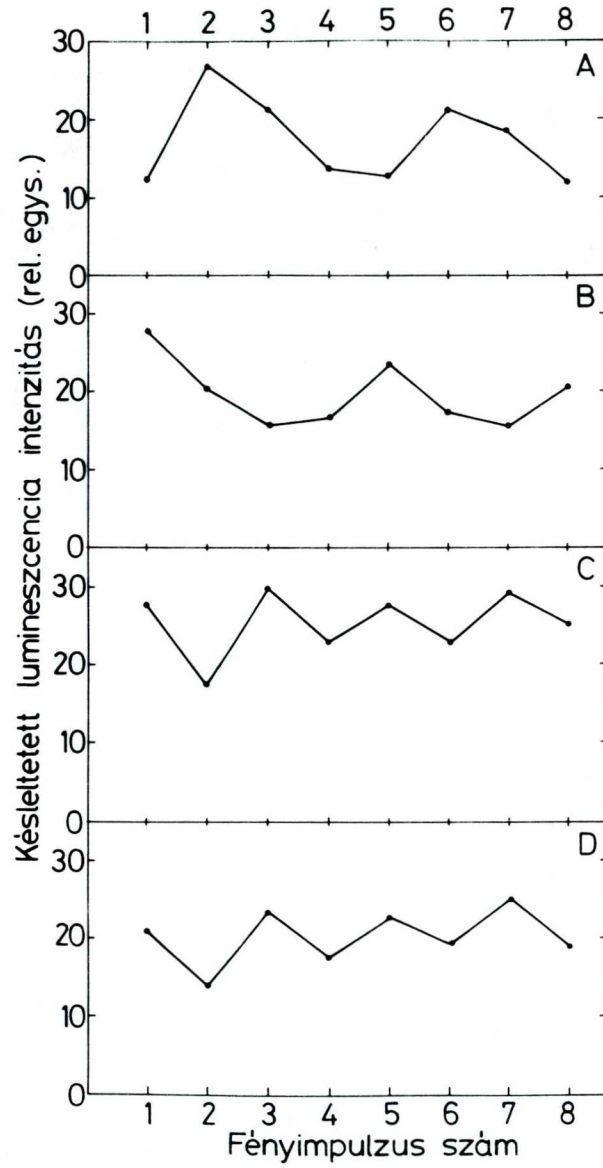
A gyors komponens eredetének vizsgálatakor célszerűnek látszott a lassu komponens esetében eredményes módszer követése: az oszcillációs képek tanulmányozása. Mivel csak a gyors komponens akartuk vizsgálni, kézenfekvő volt, hogy vizsgálatainkhoz DCMU-val kezelt kloroplasztiszokat használjunk, így azonban a gátolt elektrontranszportláncban nem érvényesülhet egynél több gerjesztő fényimpulzus hatása. Ezért, kihasználva azt az irodalomból ismert megfigyelést /Velthuys és Ames, 1974/, hogy az izolált kloroplasztiszokhoz sötétben adott DCMU a gátló hatása mellett $Q_A Q_B^- \longrightarrow Q_A^- Q_B$ irányú elektronviszsaáramlást okoz; a gyors komponens vizsgálatakor először kezeletlen mintát gerjesztettünk a megfelelő számú fényimpulzussal, majd az utolsó fényimpulzus során sötétben DCMU-t kevertünk a mintához. Így a megfigyelt késleltetett lumineszcenciában csak a gyors komponens található meg, viszont több gerjesztő fényimpulzus hatása

is tanulmányozható. A különböző számú /egytől négyig/ gerjesztő fényimpulzus után a fentiek szerint mért oszcillációs képek a következő ábrán láthatók /11. ábra/. A 11.A. ábra a frissen izolált /nem tárolt/ kloroplasztiszokban, a 11.B ábra két órán át, a 11.C ábra négy órán át szobahőmérsékleten tárolt mintákban kapott eredményeket mutatja. Látható, hogy a gyors szekundumos késleltetett lumineszcencia komponensek intenzitása a különbözőképpen tárolt mintákban rendre hasonló módon függ a gerjesztő fényimpulzusok számától, mint azt a lassu szekundumos komponensek esetében láttuk. Ez a hasonlóság még jobban megfigyelhető, ha felrajzoljuk a gyors komponens oszcillációs képeinek változását. /A gyors komponens oszcillációs képét a lassuéhoz hasonlóan vettük fel, csak a fél-élettartamok különbségére való tekintettel nem harminc, hanem öt szekundummal az utolsó gerjesztő fényimpulzus utáni intenzitásból/. A 12. ábrán bemutatjuk a gyors késleltetett lumineszcencia oszcillációs képeit frissen izolált /nem tárolt/ /12.A. ábra/, két órán át /12.B ábra/ és négy órán át sötétben, szobahőmérsékleten tárolt /12.C ábra/ minták esetében. Megállapíthatjuk, hogy az így kapott oszcillációs képek rendre megegyeznek a hasonló tárolási körülmények között a lassu késleltetett lumineszcencia komponens esetében kapottakkal. Ezt az azonosságot azzal tudjuk magyarázni, hogy a Q_B -nek gerjesztő fényimpulzussorozat hatására kialakuló redox állapota az ezután sötétben adott DCMU hatására a Q_A redoxállapotában tükröződik. Ezt figyelembe-



11. Ábra

A késleltetett lumineszcencia intenzitása 1,2,3 és 4 gerjesztő fényimpulzus esetén (balról jobbra minden oszlopban) a gerjesztés után DCMU-val kezelt kloroplasztiszokban tárolás nélkül (A) és két-(B) ill. négyórás (C) sötétben tárolás után.



12. Ábra

A kéleltetett lumineszcencia oszcillációja a gerjesztés után DCMU-val kezelt kloroplasztiszokban tárolás nélkül (A), két-(B) és négyórás (C) sötétben tárolás, ill. ferricianidos kezelés esetén(D).

véve az oszcillációs képek tárolás okozta változása most is a $Q_B:Q_B^-$ százalékos arány tárolás során bekövetkező változásának: az oxidált Q_B mennyiségi növekedésének tudható be, ez a változás azonban most az oxidált Q_A mennyiségi növekedésével jár együtt.

Kettes oszcillációt nemcsak a négy órán át szobahőmérsékleten sötétben tárolt, hanem a lassu komponens esetében ismerttetett oxidáló hatású ferricianidos kezelésnek kitett mintákban is megfigyelhetjük /12.D ábra/.

Ennek alapján, valamint az oszcillációs kép változásait a lassu komponens esetében leíró számításokkal összevetve /9A-C és 12 A-C ábrák/ azt állíthatjuk, hogy a késleltetett lumineszcencia gyors $t_{1/2} \sim 2.9s$ komponense az $S_2 Q_A^-$ és $S_3 Q_A^-$ redox-állapotokból történő rekombináció eredménye.

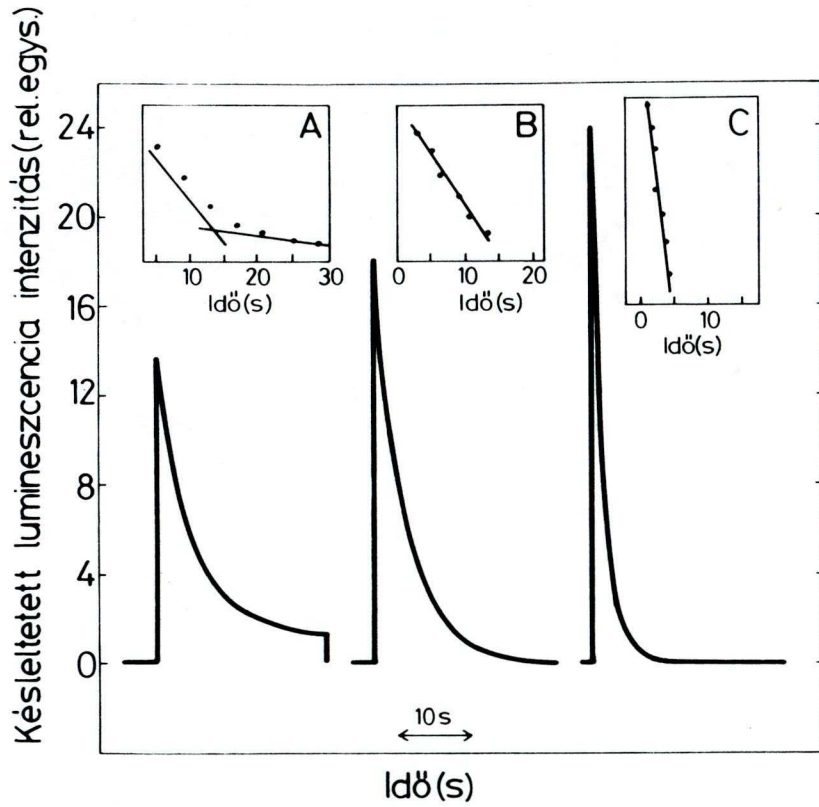
5.4. A szekundumos késleltetett lumineszcencia komponensek egy alkalmazási lehetősége

A szekundumos időtartományba eső két késleltetett lumineszcencia komponens $t_{1/2} \sim 2.9s, \sim 44s$ eredetének megadásával lehetőség nyílik arra, hogy ezt a két komponens felhasználjuk olyan folyamatok vizsgálatában, ami a komponenseket eredményező rekombináció töltésforrásait, pontosabban ezek redoxállapotát érinti. A számos lehetséges /nagyreszt kutatás alatt álló/ terület közül egy alkalmazást szeretnénk bemutatni, a szekundumos

késleltetett lumineszcencia alkalmazását a második fotokémiai rendszerben ható, elektrontranszportlánc gátló herbicidek vizsgálatában.

Mint azt már bemutattuk, az egy fényimpulzussal gerjesztett késleltetett lumineszcencia két szekundumos komponense közül a lassu komponens DCMU-kezelés hatására eltűnik, a gyors komponens viszont változatlan marad, mivel a vizbontó enzim S-állapotai csak a Q_A -n tárolt negatív töltésekkel rekombinálódhatnak. Amennyiben fenol-tipusu herbiciddel, dinosebbel /2,4 dinitro-6- /2-butyl/fenol/ kezelt kloroplasztiszokat gerjesztünk egy fényimpulzussal, a megfigyelhető késleltetett lumineszcencia szintén egy komponensű, de amint azt a 13. ábrán bemutatjuk - ahol a kezeletlen /13.A ábra/ és DCMU-val kezelt /13.B ábra/ kloroplasztiszokban tapasztalt késleltetett lumineszcenciával összehasonlítva ábrázoljuk -, ez az egyetlen komponens /13.C ábra/ gyorsabb lefutású $t_{1/2} \sim 0.7s$, mint az eddig tárgyalt gyors szekundumos komponens. Ez azt jelenti, hogy a rekombinációs folyamat, ami ezt a késleltetett lumineszcencia komponenszt eredményezi, kisebb redoxtávolságból megy végbe, mint a $t_{1/2} \sim 2.9$ szekundumos komponens esetében. Ezt a feltételezést támasztja alá az az irodalomban más jellegű mérési eredmények alapján elfogadott nézet, mely szerint a fenol-tipusu herbicidek akceptor oldali hatóhelyük mellett a donor oldalon is rendelkeznek hatóhellyel /van Assche és mtsai, 1984/.

Hatóhelyeik alapján az elektrontranszportláncot



13. Ábra

Az egy fényimpulzussal gerjesztett késleltetett lumineszcencia kezeletlen (A), a gerjesztés előtt DCMU-val (B) és dinosebbel (C) kezelt kloroplasztiszokban. Az inzerteken a megfelelő késleltetett lumineszcencia intenzitások logaritmusa látható az idő függvényében.

a második fotokémiai rendszerben gátló herbicideket két nagy csoportba osztják: DCMU-típusu és fenol-típusu herbicidekre /Pfister és Schreiber, 1984/. A feltételezett donor oldali gátlás miatt azok a pozitív töltések, amelyek a késleltetett lumineszcencia komponensét eredményező rekombinációs folyamatban résztvesznek nem a vizbontó enzim S-állapotairól, hanem egy a reakciócentrumtól kisebb redoxtávolságban levő donorról rekombinálódnak a redukált Q_A -ról származó elektronokkal. Ennek alapján a késleltetett lumineszcencia módszerével jól és gyorsan vizsgálhatók a második fotokémiai rendszerben ható elektrontranszport gátló herbicidek hatóhelyei.

6. Összefoglalás

Munkánk során a kloroplasztiszokban mérhető késleltetett lumineszcenciát vizsgáltuk a szekundumos időtartományban. Megmutattuk, hogy az itt mérhető késleltetett lumineszcencia jel két, exponenciális lecsengésű komponensre bontható: egy gyors $t_{1/2} \sim 2.9$ s/ és egy lassu $t_{1/2} \sim 44$ s/ szekundumos összetevőre.

Megállapítottuk mind a gyors, mind a lassu, szekundumos komponens eredetét: közvetlen kísérleti bizonyítékot adtunk arra, hogy a lassu komponens esetében a redukált másodlagos akceptor a rekombinációban résztvevő töltések forrása. Számítógépes modellezéssel kiegészítve megmutattuk, hogy a lassu szekundumos komponens az $S_2 Q_B^-$ és az $S_3 Q_B^-$ redoxállapotokból induló rekombinációs folyamat eredménye.

A gyors szekundumos komponensről bebizonyítottuk, hogy az $S_2 Q_A^-$ és $S_3 Q_A^-$ redoxállapotokból eredő rekombináció okozza /Hideg és Demeter, 1985/. Megállapítottuk, hogy a késleltetett lumineszcencia jól alkalmazható módszer a második fotokémiai rendszerben történő töltéstárolási folyamatok vizsgálatára, mivel az általunk azonosított késleltetett lumineszcencia komponensek fél-élettartama függ a rekombinációs folyamatban résztvevő töltések redox távolságától. Erre példaként a második fotokémiai rendszerben ható elektrontranszportláncgátló herbicidek hatóhelyvizsgálatában lehetséges alkalmazást mutattuk be /Hideg és Demeter, 1986, közlés alatt/.

Ezuton szeretném köszönetemet kifejezni Dr.Demeter Sándornak a biológiai tudományok kandidátusának, aki mint tudományos továbbképzési ösztöndíjasnak tudományos vezetőm, és akitől a kutatási feladatok kitűzése és megvalósítása során nagyon sok segítséget kaptam.

Megköszönöm Szolgáné Dr.Rózsa Zsuzsának a munkám iránt tanusított érdeklődést és a dolgozat elkészítése közben kapott hasznos tanácsokat.

Külön köszönet illeti Kiss Gábor elektromérnököt a kísérleti berendezések megépítésében és fejlesztésében nyújtott segítségéért és Sallai Anna asszisztentst, aki gazdag tapasztalatával és nagy felkészültségével a mindennapi kísérleti munka megszervezése és kivitelezése során mindvégig segítségemre volt.

Irodalom

- Amesz, J. and H.J. van Gorkom (1978): Delayed fluorescence in photosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 29, 47-66.
- Arnold, W. and J.R. Azzi (1968): Chlorophyll energy levels and electron flow in photosynthesis. *Proc. Natl. Sci. USA* 61, 29-35.
- Arnold, W. and J. Azzi (1971): The mechanism of delayed light production by photosynthetic organisms and a new effect of electric field on chloroplasts. *Photochem. Photobiol.* 14, 233-240.
- Arnold, W. and J. Thompson (1956): Delayed light production by blue-green algae, red algae and purple bacteria. *J. Gen. Physiol.* 39, 311-318.
- Arnold, W. and H.K. Sherwood (1957): Are chloroplasts semiconductors? *Proc. Natl. Sci. USA* 43, 105-114.
- Arnon, D.I. (1949): Copper enzymes in isolated chloroplasts. *Plant Physiol.* 24, 1-15.
- van Assche, C.J. (1984): Photosynthetic electron transport inhibitors: Some problems related to an accurate determination of the molecular site of action. *Z. Naturforsch.* 39c, 338-341.
- Barbieri, G., Delosme, R. and P. Joliot (1970): Comparision entre l'émission d'oxygène et l'émission de luminescence à la suite d'une série d'éclairs saturants. *Photochem. Photobiol.* 12, 197-206.
- Bertsch, W.F. and J.R. Azzi (1964): A relative maximum in the decay of long-term delayed light emission from the photosynthetic apparatus. *Biochim. Biophys. Acta* 94, 15-26.
- van Best, J.A. and L.N.M. Duysens (1977): A one microsecond component of chlorophyll luminescence suggesting a primary acceptor of system II of photosynthesis different from Q. *Biochim. Biophys. Acta* 459, 187-206.
- Björn, L.O. (1971): Far-red induced long-lived afterglow from photosynthetic cells. Size of afterglow unit and paths of energy accumulation and dissipation. *Photochem. Photobiol.* 13, 5-20.

- Bouges-Bocquet, B. (1973): Electron transfer between the two photosystems in spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 314, 250-256.
- Clayton, R.K. (1965): Characteristics of fluorescence and delayed light emission from green photosynthetic bacteria and algae. *J. Gen. Physiol.* 48, 633-646.
- Clayton, R.K. (1969): Characteristics of prompt and delayed fluorescence from spinach chloroplasts. *Biophys. J.* 9, 60-76.
- Delrieu, M.-J. (1974): Simple explanation of the misses in the cooperation of charges in photosynthetic O₂ evolution. *Photochem. Photobiol.* 20, 441-454.
- Demeter, S., Horváth, G., Joó, F., Halász, N. and Á. Faludi-Daniel (1974): Stacking ; capacity of chlorophyll forms of thylakoids in normal and mutant maize chloroplasts of different granum content. *Physiol. Plant* 32, 222-227.
- Demeter, S. and I. Vass (1984): Charge accumulation and recombination in Photosystem II studied by thermoluminescence.
- I. Participation of the primary acceptor Q and secondary acceptor B in the generation of thermoluminescence of chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 764, 24-32.
- Demeter, S., Rózsa, Zs., Vass, I. and A. Sallai (1985): Thermoluminescence study of charge recombination in Photosystem II at low temperatures. *Biochim. Biophys. Acta* 809, 369-378.
- DeVault, D., Govindjee and W. Arnold (1983): Energetics of photosynthetic glow peaks. *Proc. Natl. Sci USA* 80, 983-987.
- Droppa, M., Horváth, G., Vass, I. and S. Demeter (1981): Mode of action of Photosystem II herbicides studied by thermoluminescence. *Biochim. Biophys. Acta* 638, 210-216.
- Forbush, B., Kok, B. and M. McGloin (1971): Cooperation of charges in photosynthetic O₂ evolution. II. Damping of flash yield oscillation, deactivation. *Photochem. Photobiol.* 14, 307-321.

- Gulotty, R.J., Mets, L., Alberte, R.S. and G.R. Fleming (1985): Pico-second fluorescence study of photosynthetic mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*: origin of the fluorescence decay kinetics of chloroplasts. *Photochem. Photobiol.* 41, 487-496.
- Hideg, É. and S. Demeter (1985): Binary oscillation of delayed luminescence: Evidence of the participation of Q_B^- in the charge recombination. *Z. Naturforsch.* 40c, 827-831.
- Hideg, É. and S. Demeter (1986): Comparison of the decay of slow delayed luminescence in triazine susceptible and resistant biotypes of *Erigeron canadensis* L. *FEBS Lett.* (közlés alatt).
- Hill, F.R.S. and F. Bendal (1960): Function of the two cytochrome components in chloroplasts: a working hypothesis. *Nature (London)* 186, 136-137.
- Inoue, Y. and K. Shibata (1978): Oscillation of thermoluminescence at medium-low temperature. *FEBS Lett.* 85, 193-197.
- Joliot, P., Barbieri, G. and R. Chabaud (1969): Un nouveau modele des centres photochimiques du Systeme II. *Photochem. Photobiol.* 10, 309-329.
- Klimov, V.V., Klevanik, A.V., Shuvalov, V.A. and A.A. Krasnovsky (1977): Reduction of pheophytin in the primary light reaction of PS II. *FEBS Lett.* 82, 183-186.
- Kok, B., Forbush, B. and M. McGloin (1970): Cooperation of photosynthetic O_2 evolution. I. A linear four step mechanism. *Photochem. Photobiol.* 11, 457-475.
- Lavergne, J. and A.-L. Etienne (1980): Prompt and delayed fluorescence of chloroplasts upon mixing with dichlorophenyl-dimethylurea. *Biochim. Biophys. Acta* 593, 136-148.
- Lavorel, J. (1973): Kinetics of luminescence in the 10^{-6} - 10^{-4} s range in *Chlorella*. *Biochim. Biophys. Acta* 325, 213-229.

- Lavorel, J. (1975a): Luminescence. In: Bioenergetics of photosynthesis, ed. Govindjee, pp. 223-317. New York, Academic.
- Lavorel, J. (1975b): Fast and slow phases of luminescence in *Chlorella*. *Photochem. Photobiol.* 21, 331-343.
- Lavorel, J. (1976): Matrix analysis of the oxygen evolving system of photosynthesis. *J. Theor. Biol.* 57, 171-185.
- Malkin, S. (1977): Delayed luminescence. In: Primary processes of photosynthesis, ed. J. Barber, pp. 349-431. Amsterdam Elsevier/North Holland.
- Marquardt, D.W. (1963): An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. *J. Soc. Ind. Appl. Math.* 11, 431-441.
- Pfister, K. and U. Schreiber (1984): Comparison of diuron- and phenol-type inhibitors: Additional inhibitory action at the photosystem II donor side. *Z. Naturforsch.* 39c, 389-392.
- Pulles, M.P.J., van Gorkom, J.J. and J.G. Willemsen (1976): Absorbance changes due to the charge-accumulation species in system-2 of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 449, 536-539.
- Robinson, H.H. and A.R. Crofts (1983): Kinetics of the oxidation-reduction reactions of the photosystem II quinone acceptor complex, and the pathway for deactivation. *FEBS Lett.* 153, 221-226.
- Ruby, R.H. (1986): Delayed fluorescence in photosynthetic materials: transient response to pulsed light in *Chlorella*. *Photochem. Photobiol.* 8, 299-308.
- Rutherford, A.W., Crofts, A.R. and Y. Inoue (1982): Thermoluminescence as a probe of photosystem II photochemistry. The origin of the flash-induced glow peaks. *Biochim. Biophys. Acta* 682, 457-465.
- Rutherford, A.W. and Y. Inoue (1984): Oscillation of delayed luminescence from PS II: recombination of $S_2Q_B^-$ and $S_3Q_B^-$. *FEBS Lett.* 165, 163-170.
- Rutherford, A.W., Govindjee and Y. Inoue (1984): Charge accumulation and photochemistry in leaves studied by thermoluminescence and delayed light emission. *Proc. Natl. Sci. USA* 81, 1107-1111.

- Shuvalov, V.A. (1976): The study of primary photoprocesses in photosystem 1 of chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 430, 113-121.
- Stacy, W.T., Mar, T., Swenberg, C.E. and Govindjee (1971): An analysis of the triplet excitation model for the delayed light in *Chlorella*. *Photochem. Photobiol.* 14, 197-219.
- Strehler, B.L. (1951): The luminescence of isolated chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 34, 239-248.
- Strehler, B.L. and W. Arnold (1951): Light production by green plants. *J. Gen. Physiol.* 34, 809-820.
- Szalay László és Demeter Sándor (1986): A termolumineszcencia biológiai alkalmazásai. A biológia aktuális problémái (szerk.: Csaba György) 33, 121-159.
- Tollin, G. and M. Calvin (1957): The luminescence of chlorophyll-containing plant material. *Proc. Natl. Sci. USA* 43, 895-809.
- Vass, I., Horváth, G., Herczeg, T. and S. Demeter (1980): Determination of activation energies and half-lives of thermoluminescence bands of chloroplasts applying the method of multicomponent curve resolution. *FEBS Lett.* 116, 293-297.
- Velthuys, B.R. and J. Amesz (1973): The effect of dithionite on fluorescence and luminescence of chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 325, 126-137.
- Velthuys, B.R. and J. Amesz (1974): Charge accumulation on the reducing side of system-2 of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 333, 85-94.
- Wollman, F.-A. (1978): Determination and modification of the redox state of the secondary acceptor of photosystem II in the dark. *Biochim. Biophys. Acta* 503, 263-273.
- Wydrzynski, T. and K. Sauer (1980): Periodic changes in the oxidation state of manganese in photosynthetic oxygen evolution upon illumination with flashes. *Biochim. Biophys. Acta* 589, 56-70.